

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-192797

⑬ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和61年(1986)8月27日

C 11 C 1/08

7215-4H

C 07 C 67/56

6556-4H 審査請求 未請求 発明の数 1 (全6頁)

69/587

⑮ 発明の名称 高度不飽和酸の濃縮方法

⑯ 特 願 昭60-33476

⑰ 出 願 昭60(1985)2月21日

⑱ 発 明 者 日 比 野 英 彦 東京都練馬区旭丘2丁目22
⑱ 発 明 者 福 田 信 雄 茨城県新治郡桜村梅園2-24-5
⑲ 出 願 人 日本油脂株式会社 東京都千代田区有楽町1丁目10番1号
⑳ 代 理 人 弁理士 柳 原 成

明 細 書

1. 発明の名称

高度不飽和酸の濃縮方法

2. 特許請求の範囲

(1) 脂肪酸成分としてエイコサペンタエン酸およびドコサヘキサエン酸を含む水産生物油を分解することなく、トリグリセリドの形で逆相分配クロマトグラフィにより分画し、高度不飽和酸を高濃度で含む初期の画分を分取することを特徴とする高度不飽和酸の濃縮方法。

(2) 逆相分配クロマトグラフィが、オクタデシル基を化学結合させたシリカゲル系またはスチレン-ジビニルベンゼン共重合型合成高分子系逆相分配クロマトグラフィ用担体を充填したカラムを使用して行うものである特許請求の範囲第1項記載の方法。

(3) 逆相分配クロマトグラフィが、脂肪族ケトン、低級アルコール、アセトニトリル、ジクロルメタン、テトラヒドロフラン、n-ヘキサンおよび水から選ばれる溶離液により行うものである特

許請求の範囲第1項または第2項記載の方法。

(4) 分画が流出開始直後より分取し、分取時間の長さにより、高度不飽和酸含有量を調整するものである特許請求の範囲第1項ないし第3項のいずれかに記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、エイコサペンタエン酸(以下、EPAと記す)およびドコサヘキサエン酸(以下、DHAと記す)を含有する水産生物油よりトリグリセリドの形で高度不飽和酸を濃縮する方法に関するものである。

〔従来の技術〕

魚油中に含まれる高度不飽和脂肪酸のEPAやDHAは血小板の凝集抑制効果があり、血漿中のコレステロールや中性脂肪の量を低下させ、脳血栓や心筋梗塞等の循環器系統の予防薬としての可能性が多く報告されている。これらの油脂を摂取すると、明らかに血小板リン脂質中のアラキドン酸がEPAやDHAに置換される比率が上昇する。

しかしながら、これらの実験において投与されているEPAやDHA量は1日数g以上であり、そのため長期間に亘り多量の魚の缶詰や、育身の魚例えばイワシなどを毎食数匹食べるなどの食生活をしなければならず、日常の食生活においてこれを実施することが困難である。例えば毎日肝油でEPA4gを摂取するためには40ml、またサバでEPA10~15gを摂取するためには魚体750gが必要であり、このような食事において尿中からEPA由来のプロスタグランジンI₂が検出される。

このため魚油中の高度不飽和脂肪酸であるEPAやDHAは医薬品や健康食品としての利用が進められている。EPAやDHAは各分子中に5個および6個の二重結合がすべてシス型に、しかもメチレンインターラップテット型に配列されており、その化学合成は非常に難しく、現在行われていない。しかし自然界においては魚介類、藻類、甲殻類、水産ほ乳類等から得られる水産生物油の脂質中には多く存在し、特に青魚の魚油中には10%以上含まれているため、資源の豊富さと原料の

入手性から魚油等からの濃縮が多く検討されている。

従来、魚油等の複雑な系より目的の高度不飽和脂肪酸を多量に含む油脂を一工程で分離できる物理化学的単離手段がないので、沸点差による分子蒸留法や融点差によるウインターリング、溶解度差による溶解分別結晶法、分析的な極性差による液体クロマトグラフィおよび超低温下における固体脂分別法等を組合せて目的のグリセリドを濃縮する試みがなされている。

一方、油脂を分解して脂肪酸またはその誘導体にしてから化学的物理的处理により高度不飽和脂肪酸を濃縮し、逆相分配クロマトグラフィにより高度不飽和脂肪酸を分離精製する方法が提案されている(特開昭58-109444号)。

〔発明が解決しようとする問題点〕

しかしながら上記従来法のうち、分子蒸留法は高度不飽和脂肪酸の熱変性によるアーティファクトが生成され、ウインターリングおよび溶解分別結晶法は魚油グリセリドのような類似の連続相の

分離には固液の組成比に大きな変化がなく、また分析的な液体クロマトグラフィ法においてはその処理量が非常に微量である。超低温下における固体脂分別法においては高度不飽和脂肪酸の濃縮は可能であるが、-70℃程度の溶剤存在下での選別が必要となり、その温度制御およびその温度における母液回収が困難でその収率が低い。

油脂を分解し脂肪酸およびそれらの誘導体にしてから化学的、物理的处理により高度不飽和脂肪酸を濃縮する方法の場合、これらを再合成することは食用として不適であり、長期間食品として摂取するにはトリグリセリドの状態のままで濃縮された魚油の方が人体にとって好ましいことは明らかである。またこの方法において逆相分配クロマトグラフィにより高度不飽和脂肪酸を分離するには、流出液の成分を常に監視していて、目的とする高度不飽和脂肪酸が流出したときにその部分だけを分取しなければならないなどの問題点があった。

本発明は以上のような従来の問題点を解決する

ためのもので、水産生物油を分解することなくトリグリセリドの形で逆相分配クロマトグラフィにより分離し、高度不飽和脂肪酸を高濃度で含む初期の画分を分取することにより、簡単な操作で、食用に適した形態で高度不飽和脂肪酸を効率的に濃縮することができる高度不飽和脂肪酸の濃縮方法を提供することを目的としている。

〔問題点を解決するための手段〕

本発明は、脂肪酸成分としてエイコサペンタエン酸およびドコサヘキサエン酸を含む水産生物油を分解することなく、トリグリセリドの形で逆相分配クロマトグラフィにより分離し、高度不飽和脂肪酸を高濃度で含む初期の画分を分取することを特徴とする高度不飽和脂肪酸の濃縮方法である。

キャピラリー式のガスクロマトグラフィ(以下、GCと記す)により水産生物油のトリグリセリドの構成脂肪酸を測定したところ、ラウリン酸からテトラコセン酸に至る60~70種類の脂肪酸が検出された。また短い無極性カラムによる昇温GCおよび逆相分配カラムによる高速液体クロマトグラ

フィ(以下、HPLCと記す)でトリグリセリド組成を測定したところ、非常に広い範囲にわたる炭素数分布とそれに並行した非常に広い範囲にわたる不飽和度分布が観察され、水産生物油中の高度不飽和脂肪酸はかなりそのグリセリド中に均等に分布していることがわかった。また以上の検討から水産生物油中にはモノグリセリドやジグリセリドが非常に少ないことがわかった。

従って水産生物油中ではテトラエン酸以上の高度不飽和脂肪酸が飽和酸やモノ不飽和酸などとともにトリグリセリドを形成しているが、各脂肪酸はトリグリセリド中において炭素数と不飽和度の両方が均等分布するように存在しているものと推定される。

ところで逆相分配HPLCでのトリグリセリドの分析における流出順序については、炭素数とlog保持容量が直線関係であり、不飽和結合の数に関しては、炭素数当量、すなわち(炭素数-2×不飽和結合数)とlog保持容量が直線関係であることが知られている。例えばトリラウリン(炭素

数36)とトリリノレン(炭素数54-2×不飽和結合数9で炭素数当量36)は非常に保持容量に近い。

このためトリグリセリド中で各脂肪酸の炭素数と不飽和度の両方が均等分布する水産生物油の場合、逆相分配クロマトグラフィによるトリグリセリドの流出順序は低鎖長高不飽和度区分が前半に、高鎖長低不飽和度区分が後半に流出するから、前半部分を分画すればEPA、DHA等の高度不飽和脂肪酸が濃縮された画分を分取することができる。

そこで本発明では、EPAおよびDHAを含む水産生物油を分解することなく、トリグリセリドの形で逆相分配クロマトグラフィにより分画し、高度不飽和脂肪酸を高濃度で含む初期(前半部分)の画分を分取することにより、効率よく高度不飽和脂肪酸を濃縮し、食用に適した濃縮油を得る。

本発明において処理の対象となるのは魚介類、藻類、甲殻類、水産ほ乳類等の水産生物から得られる水産生物油である。本発明ではこれらの水産生物油を分解することなく、トリグリセリドの形

のまま分画を行うが、従来法による濃縮、精製等の前処理を行うことは差支えない。

分画に使用する逆相分配クロマトグラフィは分取用のものが好ましく、特に高圧、高速、大量分取用のものが好ましい。

逆相分配クロマトグラフィに使用するカラムは、一般に逆相分配クロマトグラフィに使用されているものが使用できるが、シリカゲル系または合成高分子系逆相分配クロマトグラフィ用担体を充填したカラムが使用でき、特にオクタデシル基を化学結合させたシリカゲル系またはスチレン-ジビニルベンゼン共重合型合成高分子系逆相分配クロマトグラフィ用担体をスラリー充填したクロマトグラフィ用カラムが好ましい。

逆相分配クロマトグラフィに使用する溶離液は、一般に逆相分配クロマトグラフィに使用されているものが使用でき、特に不飽和酸のトリグリセリドが他の成分と分離した状態で初期に流出するような溶離液が使用できる。このような溶離液としては、脂肪族ケトン、低級アルコール、アセトニ

トリル、ジクロルメタン、テトラヒドロフラン、n-ヘキサン、水等の組合せによるものがある。

好ましい溶離液としては、水0~10容量%および脂肪族ケトン90~100容量%からなる系、ならびにアセトニトリル70~90容量%、イソプロピルアルコール7~20容量%、およびn-ヘキサン3~15容量%からなる系などがあり、これらの各成分は他の成分に置換することも可能である。

逆相分配クロマトグラフィによる分画方法は、魚油等の水産生物油を分解することなくトリグリセリドの形のままで、ベンゼン、クロロホルム、アセトン、n-ヘキサン等の適当な溶媒に溶解して逆相分配クロマトグラフィ用カラムに注入し、次いで逆相分配クロマトグラフィ用溶離液を流して分画を行う。

このような逆相分配クロマトグラフィにより、先頭成分としてモノおよびジグリセリドが流出するが、これらは微量であるので、特に捨てる必要はない。次いでトリグリセリドが流出するが、EPA、DHA等の高度不飽和酸は初期に流出し、

前半流出部に大部分の高度不飽和酸が流出する。原料油の組成によっては不飽和酸の流出が途中から流出を始めることがあるが、それ以前の流出液もそのまま分取することができる。

こうして流出開始直後より分取を始め、高度不飽和酸の大部分が流出する前半部の流出により分取を終了すれば、高度不飽和酸を高濃度に含む濃縮油を得ることができる。分取の終了点は、分取した全濃縮油のEPA濃度が18重量%以上となる点が一応の目安となり、分取時間の長さにより高度不飽和酸含有量を調整することができる。分取時間の長さの代りに流出液量により分取の終了点を決めてもよく、場合によっては屈折率レスポンス等により行ってもよい。分取した流出液は脱溶剤を行うことにより、高度不飽和酸が濃縮された濃縮油を得ることができる。

以下、実験結果について説明すると、逆相分配HPLCに使用できる、市販の分析用オクタデシル基を化学結合させたシリカカラム、ならびにスチレン-ジビニルベンゼン共重合体によって作ら

特にEPAに関しては、特定の範囲内においては30%以上含有する区分が認められ、さらにその区分の前後の分画範囲を広げることにより、収量が高めることができるが、収量の増加程度が回収油中のEPA含量の低下と相関しているので、目標設定値により分画範囲を設定でき、経済性を考慮して任意な含量を得ることができる。

以上の操作において、原料油を分解する必要はなく、また高度不飽和酸は初期に流出するので、分画の開始とともに分取を開始すればよく、流出成分を常に監視している必要はないとともに、分取の終了点も容易に決定できるため、操作が極めて容易である。また得られる濃縮油はトリグリセリドの形であり、再合成の必要はないので食用として適している。

〔発明の効果〕

本発明によれば、水産生物油を分解することなく、トリグリセリドの形のままで逆相分配クロマトグラフィにより分画し、初期の画分を分取するようにしたので、簡単な操作で、食用に適した形

れたハイポーラスポリマーゲルカラムを用いて水産生物油のグリセリドを分離濃縮したところ、両カラムとも先頭成分として微量のモノおよびジグリセリドが流出した後、トリグリセリドと思われるピークが、不飽和度推定のために同一条件で分析したトリリノレン（不飽和結合数9）流出位置より前から流出を開始して、非常に広範囲にわたって数十本出現し、流量および溶離液組成によりそのピーク数は変化し、植物油グリセリドによって構造が確認されている炭素数16~18群によって構成されるトリグリセリドからは全く同定できなかった。しかしながら分析カラムにてサンプル溶媒が溶出してから最終ピークが流出し終るまでの溶離液を一定量ずつ連続的に分取して、その分画されたトリグリセリドを脂肪酸メチルに誘導してガスクロマトグラフィにて測定した結果、高度不飽和酸が高濃度に濃縮された区分が最先頭の流出部より確認され、また重量収率の点からも前半流出部から十分高度不飽和酸が回収されることがわかった。

態で高度不飽和酸を効率的に濃縮することができる。

〔実施例〕

以下、本発明の実施例について説明する。

実施例1

マイワシから窒素気流下で煮取法によりイワシ油500gを得た。この油は日本油化学協会制定のガードナー法による標準番号は5番であり、過酸化価値は3.2、ヨウ素価は185、ケン化価は193、曇点は-9℃であった。この油脂の一部をケン化分解後、三フッ化ホウ素メタノール溶液で加熱還流し、エステル交換反応により全脂肪酸をメチルエステルに変えてからガスクロマトグラフィ法により脂肪酸組成を分析した結果、EPAの含有量は14%、DHAの含有量は8%であった。

このイワシ油12.0gをn-ヘキサンに溶解し、スチレン-ジビニルベンゼン共重合体によりハイポーラスポリマーゲル HP-20（三菱化成工業（株）製）を充填したカラム（内径×長さ1.91cm×50cm、充填容積157ml、充填量81.6g）に注入した。溶離

液としてアセトン/水 (96/4 vol/vol) を流量1.0 ml/minで、20~70mlの各フラクションに分画しながら2 ml流した。さらにカラム内残存油脂を溶出させるため、アセトン1 ml、メタノール1 mlを流した。溶離液中の溶質濃度は、溶離液の一部をバイパスに流して液体クロマトグラフィ用屈折率検出器(エルマ光学(株)製)でモニターした。その結果、溶質が溶離液中に出始めるのは溶離液が500 ml流れた時点からであった。それ以降の全画分はそれぞれ脱溶剤後、その一部を採取して前記と同様にメチルエステルに変えてからガスクロマトグラフィ法により脂肪酸組成を測定した。

溶離液によって溶出されたフラクション番号と溶質濃度の関係、および溶質重量と脂肪酸組成から求めたEPAの溶出重量の関係を第1図に示した。溶質中のEPA濃度は、溶離液の700~800 ml溶出部で30%を越え、重量収率は6%であった。またこの流出部近辺の前後区分、すなわち溶離液で500~900 ml、溶出部全体でEPA含有量は25.1%で、重量収率は34.2%であった。第1図の矢印

を反応させて化学結合した全多孔性球状のYMC-GEL ODS-30/50((株)山村化学研究所製)を充填したカラム(内径×長さ1.9 cm×50 cm、充填容積157 ml、充填量93.3 g)に注入した。溶離液としてアセトニトリル/イソプロピルアルコール/n-ヘキサン(12/3/1 vol/vol/vol)を流量1.0 ml/minで流し、溶剤ピーク流出後から全フラクション流出までの全区間の初流出部の25%、およびその後に出出した25%に相当する溶離液とを分取した。さらにカラム内残存油脂を溶出させるためアセトン1 ml、メタノール1 mlを流した。

溶離液中の溶質濃度は溶離液の一部をバイパスに流して液体クロマトグラフィ用屈折率検出器(エルマ光学(株)製)でモニターした。初流出部とその次の前半流出部の画分は、それぞれ脱溶剤後、その一部を採取してメチルエステルに変えてからガスクロマトグラフィ法により脂肪酸組成を測定した。溶離液によって溶出された溶質濃度と溶出時間との関係を第2図に示した。初流出部(矢印B範囲)の重量収率は27.5%で、EPA含有量は

A範囲の高度不飽和酸濃縮魚油の分析値および物性値は下記の通りである。

分析値: EPA 25.1%、DHA 13.4%

物性値: 淡黄色液体、 n_D^{20} 1.4901、ケン化価 187、

ヨウ素価 254、粘度 36.6cP(30℃)、

曇点 -10℃、比重 d_4^{20} 0.9340、

過酸化価 4.2、不ケン化物量 1.6%

実施例 2

マサバから窒素気流下で煮取法によりマサバ油500 gを得た。この油は日本油化学協会制定のガードナー法による標準番号は5番であり、過酸化価は2.8、ヨウ素価は159、ケン化価は192、曇点は-4℃であった。この油脂の一部をケン化分解後、三フッ化ホウ素メタノール溶液で加熱還流し、エステル交換反応により全脂肪酸をメチルエステルに変えてからガスクロマトグラフィ法により脂肪酸組成を分析した結果、EPAの含有量は9.5%、DHAの含有量は11.5%であった。

このマサバ油12.0 gをn-ヘキサンに溶解し、オクタデシルジメチルクロルシランとシリカゲル

25.1%で、その次の前半流出部(矢印C範囲)の重量収率は8.7%で、EPA含有量は21.9%であった。第2図の初流出部の矢印B範囲の高度不飽和酸濃縮魚油の分析値および物性値は下記の通りである。

分析値: EPA 25.1%、DHA 10.7%

物性値: 淡黄色液体、 n_D^{20} 1.4987、ケン化価 189、

ヨウ素価 239、粘度 35.9cP(30℃)、

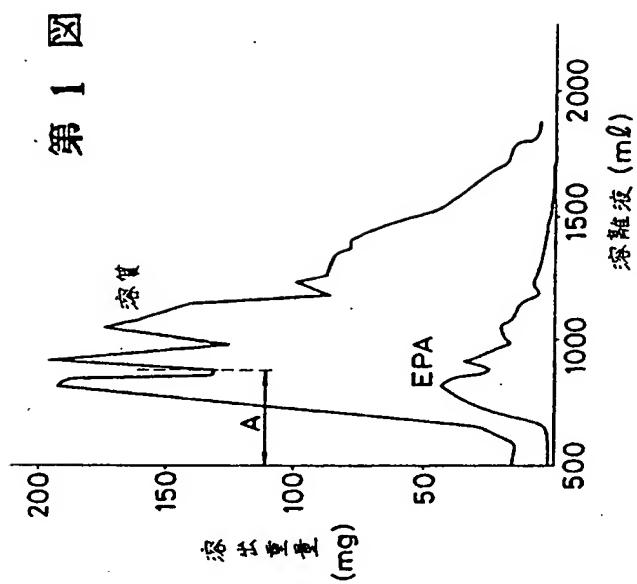
曇点 -8℃、比重 d_4^{20} 0.9340、

過酸化価 3.8、不ケン化物量 1.8%

4. 図面の簡単な説明

第1図は実施例1のクロマトグラム、第2図は実施例2のクロマトグラムである。

代理人 弁理士 柳 原 成



第2図

